

# SYSTEM FOR ADMINISTERING DRUG INCLUDING INTERACTION BETWEEN PROTEIN OR POLYPEPTIDE AND BIOLOGICALLY DECOMPOSABLE HYDROPHOBIC POLYMER

**Publication number:** JP5103838 (A)

**Publication date:** 1993-04-27

**Inventor(s):** PATORITSUKU PII DERUKA +

**Applicant(s):** UNIV KENTUCKY RES FOUND +

**Classification:**

- international: **A61K38/00; A61K38/22; A61K38/23; A61K47/34; A61K47/48; A61K9/16; A61K9/52; A61M37/00; A61K38/00; A61K38/22; A61K38/23; A61K47/34; A61K47/48; A61K9/16; A61K9/52; A61M37/00; (IPC1-7): A61K37/02; A61K37/24; A61K37/30; A61K47/34; A61K47/48; A61M37/00**

- European: **A61K47/48H; A61K47/48K6; A61K9/16H6D4**

**Application number:** JP19910179588 19910719

**Priority number(s):** US19900554427 19900719

**Also published as:**

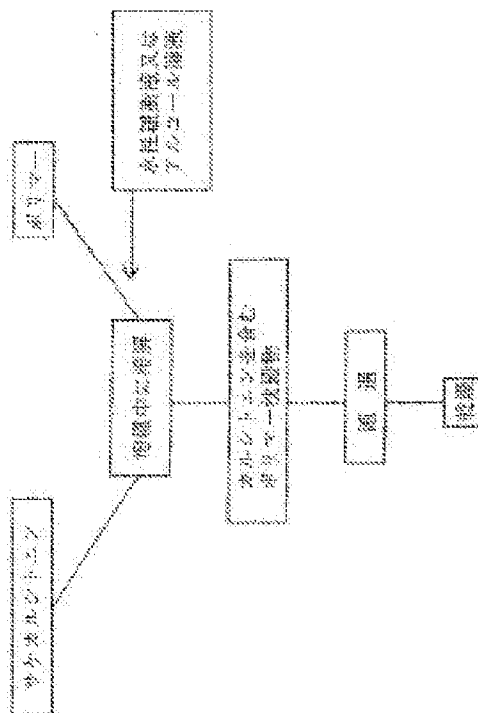
EP0467389 (A2)  
EP0467389 (A3)  
EP0467389 (B1)  
ZA9105584 (A)  
PT98397 (B)  
NZ238951 (A)  
NO912769 (A)  
MX9100249 (A)  
GR3032056 (T3)  
FI913455 (A)  
FI104954 (B1)  
ES2138584 (T3)  
DK0467389 (T3)  
DE69131677 (T2)  
CS9102248 (A3)  
CA2046830 (C)  
AU656897 (B2)  
AT185269 (T)

<< less

## Abstract of JP 5103838 (A)

**PURPOSE:** To generate a stable pharmaceutical object in which a physical interaction exists between a polymer and protein or polypeptide so that the protection and controlled release of the protein or polypeptide are achieved on the in-vivo basis.

**CONSTITUTION:** A protein or polypeptide such as calcitonin, insulin, angiotensin, vasopressin, desmopressin, etc., and a hydrophobic biodegradable polymer such as polyester, polyorthoester, polyunhydrate, etc., are dissolved in a specified solvent. Through the physical interaction between these two sorts of substances, a sediment containing such substances is built up. The obtained sediment is filtrated and dried. Thus a stable pharmaceutical object is produced in which protein or polypeptide is taken in the hydrophobic biodegradable polymer.



Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-103838

(43)公開日 平成 5 年(1993) 4 月27日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 M 37/00		7720-4C		
A 6 1 K 37/02		8314-4C		
37/24		8314-4C		
37/30		8314-4C		
47/34	C	7329-4C		

審査請求 未請求 請求項の数29(全 18 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平3-179588	(71)出願人	591157305 ユニバーシテイ オブ ケンタツキー リ サーチ ファウンデーション アメリカ合衆国, ケンタツキー 40506, レキシントン, ユニバーシテイ オブ ケ ンタツキー, グラハム アベニュー 120, ミネラル インダストリーズ ビルデイン グ 107
(22)出願日	平成 3 年(1991) 7 月19日	(72)発明者	バトリック ビー. デルカ アメリカ合衆国, ケンタツキー 40502, レキシントン, ナンタケット 3292
(31)優先権主張番号	5 5 4 4 2 7	(74)代理人	弁理士 青木 朗 (外 3 名)
(32)優先日	1990年 7 月19日		
(33)優先権主張国	米国 (U S)		

(54)【発明の名称】 タンパク質又はポリペプチドと疎水性生物分解性ポリマーとの相互作用を包含する薬物投与システム

(57)【要約】

【目的】 制御された薬物投与システムに関する。

【構成】 タンパク質又はポリペプチドの保護及び制御された開放がインビボで達成されるように、物理的相互作用がポリマーとタンパク質又はポリペプチドとの間に存在することを特徴とする、疎水性生物分解性ポリマー及びタンパク質又はポリペプチドを含んで成る薬物投与システムに関する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 疎水性生物分解性ポリマー及びタンパク質又はポリペプチドを含んで成る、タンパク質又はポリペプチドの制御された開放のための薬物投与システムであって、タンパク質又はポリペプチドの保護及び制御された開放がインビボで達成されるように、物理的相互作用が前記ポリマーとタンパク質又はポリペプチドとの間に存在することを特徴とする薬物投与システム。

【請求項2】 前記ポリマーがポリエステル、ポリオルトエステル及びポリ無水物から成る群から選択される請求項1記載の薬物投与システム。

【請求項3】 前記ポリエステルがポリグリコール酸、ポリ乳酸及びクリコリドとL-ラクチドとのコポリマーから成る群から選択される請求項2記載の薬物投与システム。

【請求項4】 前記タンパク質又はポリペプチドが、カルシトニン、インシュリン、アンギオテンシン、バソプレッシン、デスモプレッシン、黄体形成ホルモン放出ホルモン、ソマトスタチン、グルカゴン、ソマトメデ、オキシトシン、ガストリン、セクレチン、ヒト心房ナトリウム排泄増加ポリペプチド、副腎皮質刺激ホルモン、メラニン細胞刺激ホルモン、 $\beta$ -エンドルフィン、ムラミルジペプチド、エンケファリン、ニューロテンシン、ボンベシン、VIP、CCK-8、副甲状腺ホルモン、カルシトニン遺伝子関連ペプチド、エンドテリン、甲状腺開放ホルモン、成長ホルモン及びリンフォカインから成る群から選択される請求項1記載の薬物投与システム。

【請求項5】 前記タンパク質又はポリペプチドがカルシトニンである請求項4記載の薬物投与システム。

【請求項6】 ポリグリコール酸、ポリ乳酸及びグリコリドとL-ラクチドとのコポリマーから選択された疎水性生物分解性ポリマー及びカルシトニンを含んで成る、タンパク質又はポリペプチドの制御された開放のための薬物投与システムであって、カルシトニンの制御された開放がインビボで達成されるように、物理的相互作用が前記ポリマーとカルシトニンとの間に存在することを特徴とする薬物投与システム。

【請求項7】 疎水性生物分解性ポリマー及びタンパク質又はポリペプチドを含んで成る、タンパク質又はポリペプチドの制御された開放のための経口薬物投与システムであって、物理的相互作用が前記ポリマーとタンパク質又はポリペプチドとの間に存在し、それによってタンパク質又はポリペプチドの保護及び制御された開放がインビボで達成され、そして損なわれていない薬物投与システムが胃腸管から粘膜内層に吸収されることを特徴とする薬物投与システム。

【請求項8】 前記ポリマーがポリエステル、ポリオルトエステル及びポリ無水物から成る群から選択される請求項7記載の薬物投与システム。

【請求項9】 前記ポリエステルがポリグリコール酸、ポリ乳酸及びクリコリドとL-ラクチドとのコポリマーから成る群から選択される請求項8記載の薬物投与システム。

【請求項10】 前記タンパク質又はポリペプチドが、カルシトニン、インシュリン、アンギオテンシン、バソプレッシン、デスモプレッシン、黄体形成ホルモン放出ホルモン、ソマトスタチン、グルカゴン、ソマトメデ、オキシトシン、ガストリン、セクレチン、ヒト心房ナトリウム排泄増加ポリペプチド、副腎皮質刺激ホルモン、メラニン細胞刺激ホルモン、 $\beta$ -エンドルフィン、ムラミルジペプチド、エンケファリン、ニューロテンシン、ボンベシン、VIP、CCK-8、副甲状腺ホルモン、カルシトニン遺伝子関連ペプチド、エンドテリン、甲状腺開放ホルモン、成長ホルモン及びリンフォカインから成る群から選択される請求項7記載の薬物投与システム。

【請求項11】 前記タンパク質又はポリペプチドがカルシトニンである請求項10記載の薬物投与システム。

【請求項12】 タンパク質又はポリペプチドの制御された開放のための薬物投与システムを調製するための方法であって：

- a) タンパク質又はポリペプチド及び疎水性生物分解性ポリマーを溶媒中に溶解し、そして
- b) 前記タンパク質又はポリペプチドと前記ポリマーとの相互作用の結果とに形成される、タンパク質又はポリペプチド及びポリマーを含む沈殿物を形成することを含んで成る方法。

【請求項13】 前記沈殿物が溶媒、タンパク質又はポリペプチド及びポリマーを含んで成る溶液を冷却することによって形成される請求項12記載の方法。

【請求項14】 前記沈殿物が大きさを減じられる請求項12記載の方法。

【請求項15】 タンパク質又はポリペプチドの制御された開放のための薬物投与システムを調製するための方法であって：

- a) タンパク質又はポリペプチド及び疎水性生物分解性ポリマーを第1溶媒中に溶解し、そして
- b) タンパク質又はポリペプチドとポリマーとの相互作用の結果として形成される、タンパク質又はポリペプチド及びポリマーを含む沈殿物を形成するために、タンパク質又はポリペプチドを溶解することができるが、しかし疎水性生物分解性ポリマーを溶解しない第2溶媒中に前記溶液を添加することを含んで成る方法。

【請求項16】 前記ポリマーがポリエステル、ポリオルトエステル及びポリ無水物から成る群から選択される請求項15記載の薬物投与システム。

【請求項17】 前記ポリエステルがポリグリコール酸、ポリ乳酸及びクリコリドとL-ラクチドとのコポリマーから成る群から選択される請求項16記載の薬物投

与システム。

【請求項18】 前記タンパク質又はポリペプチドが、カルシトニン、インシュリン、アンギオテンシン、バソプレッシン、デスモプレッシン、黄体形成ホルモン放出ホルモン、ソマトスタチン、グルカゴン、ソマトメデ  
ン、オキシトシン、ガストリン、セクレチン、ヒト心房  
ナトリウム排泄増加ポリペプチド、副腎皮質刺激ホルモ  
ン、メラニン細胞刺激ホルモン、 $\beta$ -エンドルフィン、  
ムラミルジペプチド、エンケファリン、ニューロテンシ  
ン、ボンベシン、VIP、CCK-8、副甲状腺ホルモ  
ン、カルシトニン遺伝子関連ペプチド、エンドテリン、  
甲状腺開放ホルモン、成長ホルモン及びリンフォカイン  
から成る群から選択される請求項15記載の薬物投与シ  
ステム。

【請求項19】 前記タンパク質又はポリペプチドがカルシトニンである請求項18記載の薬物投与システム。

【請求項20】 前記第1溶媒が塩化メチレン、ヘキサフルオロアセトン、ヘキサフルオロイソプロパノール、アセトニトリル、ヘキサン及びシクロヘキサンから成る群から選択される請求項15記載の方法。

【請求項21】 前記第2溶媒が水、水性緩衝液及び水性アルコール混合物から成る群から選択される請求項15記載の方法。

【請求項22】 前記沈殿物が大きさを減じられる請求項15記載の方法。

【請求項23】 タンパク質又はポリペプチドの制御された開放のための薬物投与システムを調製するための方法であって、タンパク質又はポリペプチド及び疎水性生物分解性ポリマーを含む微小球体を形成することを含んで成り、それによって物理的相互作用がタンパク質又はポリペプチドと疎水性生物分解性ポリマーとの間に存在することを特徴とする方法。

【請求項24】 タンパク質又はポリペプチドの制御された開放のための薬物投与システムを調製するための方法であって：

a) 第1槽を形成するためにタンパク質又はポリペプチド及び疎水性生物分解性ポリマーを溶媒中に溶解し；  
b) 懸濁液を得るために連続溶媒第2槽に前記第1槽を分散し；そして

c) タンパク質又はポリペプチドとポリマーとの相互作用の結果として形成される、タンパク質又はポリペプチド及びポリマーを含む沈殿物を得るために、溶媒抽出物を凍結乾燥することによって前記懸濁液から前記溶媒を除去することを含んで成る方法。

【請求項25】 前記ポリマーがポリエステル、ポリオルトエステル及びポリ無水物から成る群から選択される請求項24記載の薬物投与システム。

【請求項26】 前記ポリエステルがポリグリコール酸、ポリ乳酸及びクリコリドとL-ラクチドとのコポリマーから成る群から選択される請求項25記載の薬物投

与システム。

【請求項27】 前記タンパク質又はポリペプチドが、カルシトニン、インシュリン、アンギオテンシン、バソプレッシン、デスモプレッシン、黄体形成ホルモン放出ホルモン、ソマトスタチン、グルカゴン、ソマトメデ  
ン、オキシトシン、ガストリン、セクレチン、ヒト心房  
ナトリウム排泄増加ポリペプチド、副腎皮質刺激ホルモ  
ン、メラニン細胞刺激ホルモン、 $\beta$ -エンドルフィン、  
ムラミルジペプチド、エンケファリン、ニューロテンシ  
ン、ボンベシン、VIP、CCK-8、副甲状腺ホルモ  
ン、カルシトニン遺伝子関連ペプチド、エンドテリン、  
甲状腺開放ホルモン、成長ホルモン及びリンフォカイン  
から成る群から選択される請求項24記載の薬物投与シ  
ステム。

【請求項28】 前記タンパク質又はポリペプチドがカルシトニンである請求項27記載の薬物投与システム。

【請求項29】 前記沈殿物が大きさを減じられる請求項24記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、一般に、生物学的に活性な薬剤の徐放のための生体分解性ポリマーの分野に関する。より詳しくは、本発明は、制御されたサイズの疎水性生体分解性ポリマーを調製する方法であって、該ポリマーの中に取り込まれたタンパク質またはポリペプチドとの物理的相互作用が存在する方法に関する。そのような相互作用は、ポリマーマトリックス中へのタンパク質またはポリペプチドの取り込みを促進し、そしてタンパク質またはポリペプチドの保護および該ポリマーからの徐放に備える。

【0002】

【従来の技術】今までに治療薬または他の薬剤の速度制御放出のために種々様々なマイクロカプセル化ドラッグデリバリーシステムが開発されている。例えば、ポリエステル、例えばポリ( $\epsilon$ -カプロラクトン)、ポリ( $\epsilon$ -カプロラクトン-CO-DL-乳酸)、ポリ(DL-乳酸)、ポリ(DL-乳酸-CO-グリコール酸)およびポリ( $\epsilon$ -カプロラクトン-CO-グリコール酸)中に治療薬を取り込むことに相当な研究が向けられており、この場合放出は拡散制御された。例えば、Pitt, C.G., G ratzl, M.M., Jeffcoat, A.R., Zweidinger, R., Schindler, A., "Sustained Drug Delivery Systems. II. Factors Affecting Release Rates from Poly( $\epsilon$ -caprolactone) and Related Biodegradable Polyesters", J. Pharm. Sci., 68, 1534 (1979) を参照のこと。それらの系はフィルムおよびカプセルとして製造され、そして結果は薬剤の放出が本質的に完了した後に浸食するように該装置を調製できることを示唆した。ポリエステルの分解は、自己触媒反応によるエステル結合のランダムな加水分解的開裂により進行し、鎖の開裂速度は化学的および

10

20

30

40

50

形態的要因により影響されると報告されている。

【0003】グリコール酸-乳酸コポリマー中の抗マラリア薬およびスルファジアジンの持続性系も報告されている。Wise, D.L., Gesser, J.D., McCormick, G.J., "Sustained Release of a Dual Anti-malarial System", J. Pharm. Pharmacol., **31**, 201 (1979); Wise, D.L., McCormick, G.J., Willett, G.P., Anderson, L.C., Howes, J.F., J. Pharm. Pharmacol., **30**, 686 (1978)。上記研究者らにより報告された方法は、薬剤を適当な溶剤中に溶解し、常法に従ってフィルムを噴霧乾燥または鋳造し、そして溶剤を蒸発させることを含む。様々な麻酔薬拮抗剤およびステロイドがフィルム中に取り込まれ、そしてラットに移植されており〔例えば、Woodland, J.H. R., Yolles, S., Blake, D.A., Helrich, M., Meyer, F.J., "Long-Acting Delivery Systems for Narcotic Antagonists", J. Med. Chem., **16**, 897 (1973); Jackanicz, T.M., Nash, H.A., Wise, D.L., Gregory, J.B., "Polyactic Acid as a Biodegradable Carrier for Contraceptive Steroids", Contraception, **8**, 227 (1973); Anderson, L.C., Wise, D.L., Howes, J.F., "An Injectable Sustained Release Fertility Control System", Contraception, **13**, 375 (1976)を参照のこと〕、粒子中に封入されそして皮下に注入されている〔Yolles, S., "Time-Release Depot for Anticancer Drugs: Release of Drugs Covalently Bonded to Polymers", J. Parent. Drug Assoc., **32**, 188 (1978)〕。多数の抗腫瘍薬の放出が、報告された移植可能な系において評価されており〔Yolles, S., "Time-Release Depot for Anticancer Drugs: Release of Drugs Covalently Bonded to Polymers", J. Parent. Drug Assoc., **32**, 188 (1978)〕、抗生物質ミトマイシンCがゼラチンの微小球担体中に封入されそして静脈内投与されている〔Yoshioka, T., Hashida, M., Muranishi, S. および Sezaki, H., "Specific Delivery of Mitomycin C to Liver, Spleen and Lung: Nano- and Microspherical Carriers of Gelatin", Intern. J. Pharm., **81**, 131 (1981)〕、そして生体内分布に対するサイズの効果および抗生物質標的の可能性が検討された。最後に言及した刊行物において報告された微小球のサイズ分布（即ち5〜30 μm）は、特に静脈内投与について非常に広範囲であった。最近、溶剤蒸発法により調製されたポリ乳酸球からの局部麻酔薬の試験管内放出が同様に報告されている〔Wakiyama, N., Kaxuhiko, J., Nakano, M., "Influence of Physicochemical Properties of Polylactic Acid on the Characteristics and In Vitro Release Patterns of Polylactic Acid Microspheres Containing Local Anesthetics", Chem. Pharm. Bull., **30**, 2621 (1982)〕。それらのポリ乳酸からの放出パターンがポリマーの様々な分解の程度並びに

った。更に、薬剤の溶解性が放出の速度および程度に重要な役割を果たすことは明らかである。走査型電子顕微鏡写真は、放出後の球体の浸食および変形の様々な程度を明らかにした。

【0004】今までのポリマー系からの医薬または他の剤の徐放性デリバリーは主として経口、局所または移植系に限定されており、ここで担体マトリックス内部の孔の大きさおよび／または気泡の大きさ並びに投与される微小球の全体の寸法に関する考察は、生体適合的観点からの放出速度および相対吸収速度と共に、特に本発明が適用可能である非経口、即ち静脈内、動脈内、筋肉内、皮下、眼内または吸入投与経路のための微小球デリバリーシステムの利用を伴う評価パラメーターと明白に異なることは理解されるだろう。

【0005】例えば、米特許第 4,818,542号は、連続通路の球状微小加工重合網状構造から成る徐放性ドラッグデリバリーシステムを記載している。更に、治療薬としてのタンパク質およびペプチドの利用は認識されており、それらの利用可能性の増加のため医薬用品に占めるそれらの位置が増大しつつある。この利用可能性は、主に遺伝子操作およびバイオテクノロジーにおける最近の進歩によるものである。不運にも、常用の投与経路によるタンパク質様薬剤の使用は、通常様々なデリバリーの問題により妨害される。非経口投与でない経路、即ち経口および経皮は、主に血流中へのタンパク質様薬剤の乏しい吸収および胃腸道におけるそのような薬剤の分解のため、不十分である。薬剤を非経口投与すると、タンパク質様薬剤の迅速なタンパク質分解による不活性化も起こり、その生体適合性が減少する。加えて、非経口経路により投与した時、宿主の免疫系が活性化され、それによっておそらく一連の望ましくない免疫反応を引き起こすだろう。

【0006】前述の点から見て、従来技術の投与方法に関連する課題を解決するために、ペプチドおよびタンパク質の代替的な非経口デリバリーシステムを開発する相応な努力がなされている。例えば、移植可能装置は、ポリ（ヒドロキシエチル）メタクリレート、ポリビニルアルコール、エチレンビニルアセテートコポリマー（EVA）およびシリコーンエラストマーから鋳造または成形されている。巨大分子薬剤はそれらの装置中に埋没されている。典型的な調製方法は、担体のタンパク質またはペプチドといった巨大分子薬剤の粉末を、ポリマーを含む溶液中に懸濁することを含む。次いで組成物全体を溶媒蒸発または加硫により所望のサイズおよび形状に鋳造または成形する。それらの装置からの巨大分子の持続放出は証明されている。上記の従来技術の方法の主たる利点は、それが簡単なことである。

【0007】上記の難点を回避するために、米特許第 4,741,872号は、生物学的に活性な巨大分子薬剤が中に物理的に封入されている三次元網状構造を有する生体分

解性微小球を開示している。多数の他のタイプのタンパク質／ポリマー系が当業界において既知である。例えば、米特許第 3,843,446号、第 3,977,941号および第 4,601,981号は、他のタンパク質膜を酵素水溶液で処理することによる酵素活性タンパク質－酵素複合体の調製を開示している。この膜は酵素反応を行うのに用いられる。

【0008】米特許第 3,972,776号は、合成または天然タンパク質巨大分子と全微生物細胞を含む分散液を形成せしめ、分散液から膜を鋳造しそして膜を乾燥することによる、酵素反応を行うのに適当な酵素活性タンパク質－全微生物細胞複合体膜の調製を開示している。膜は、巨大分子と細胞を含む分散液からの電気同時蒸着によっても形成せしめることができる。

【0009】米特許第 4,758,342号は、支持層と分離層を含む高速濾過膜に関する。米特許第 4,494,944号および第 4,557,855号は、リグニンスルホン酸、および所望により、少なくとも 10個の炭素原子を有する遊離アルキルアリアルスルホン酸および約 2,500～約 15,000の分子量を有する 8 ポリペプチドから成る界面活性剤を開示している。

【0010】米特許第 4,585,797号および第 4,591,501号は、ポリペプチド、可塑剤およびフィルム形成性軟質ポリマーの物理的混合物から成る軟質連続フィルムを開示しており、該フィルムが給湿すると、ポリペプチドがその中から滲出する。米特許第 4,873,033号は、支持層と分離層を含む高速濾過膜に関する。支持層は、架橋した単分子フィルムから成り、未架橋状態の分離層の分子は、少なくとも 1つの疎水性鎖および少なくとも 1つの親水性基を含む界面活性剤または界面活性剤様脂質分子である。界面活性剤様脂質分子は或る塗布圧力下で塗布されるか、または水溶液の表面上の平均空間もしくは水溶液とその水溶液と不混和性の液体との間の界面を占める。

【0011】米特許第 4,897,447号は、固定化された蛍光生成支持体に関する。該支持体は、次の構造を有する：



ここで  $R_1$  は酵素特異的オリゴペプチドを表し； $R_2$  はスペーサー基を表し、それ自体ポリマーとのカップリングに相当する官能基を有するポリメチレン鎖に結合したメチレンカルボキシルオキシ、メチレンカルボキサミドまたはメチレンスルホンアミド基であり； $R_3$  は生物学的に不活性なポリマーであり；そして  $R_4$  は蛍光生成成分を表す。

【0012】GB 2 207 050は、12より大きい D. P. のグルコースポリマーを少なくとも 50重量%含むグルコースポリマー混合物と薬剤の水溶液を含んで成る組成物を開示している。該組成物は腹腔内に導入される。このグルコースポリマーは腹膜の透析の浸透性剤として

作用する。EP 0 354 714は、通常グリコサミノグリカンに結合している生物活性ペプチドおよびタンパク質の組織再分散性に影響を及ぼし、そして生物学的相互作用におけるグリコサミノグリカンの作用を模倣するための医薬組成物を開示している。該組成物は、1,000～20,000ダルトンの分子量およびモノマー単位を有する医薬上許容されるポリマー化合物を含んで成り、ここで各モノマー単位は 3～約 10個の芳香族環を含む。

【0013】EP 0 187 547は、低分子量の生物活性分子に共有結合した不活性合成ポリマー担体を含んで成る高分子薬剤に関する。飲作用として知られる基質選択的機構を行うことができる細胞に取り込みが限定されるため、ドラッグデリバリーが幾分標的される。

【0014】

【発明が解決しようとする課題】多数の従来技術にもかかわらず、従来のドラッグデリバリーシステムはまだ幾つかの重大な欠点を有しており、そして特に十分な薬剤の負荷、製品の詳細の再現性およびスケールアップに関して商品化を行うにはまだ困難である。

【0015】

【課題を解決するための手段】従って、本発明の目的は、ポリペプチドおよびタンパク質を疎水性生体分解性ポリマー中に取り込み、安定な製剤を提供し且つ生体内での該ポリマーからのポリペプチドまたはタンパク質の徐放を獲得する 1 または複数の方法を提供することである。

【0016】本発明の他の観点、生体内でのポリマーからのポリペプチドまたはタンパク質の徐放を考慮したドラッグデリバリーシステムそれ自体を提供することである。ここで、前記取り込み、保護および徐放はポリペプチドまたはタンパク質と疎水性生体分解性ポリマーとの間の物理的相互作用によるものである。

【0017】本発明の更なる目的は、高い局所濃度、持続した活性、全身投与および治療を提供する注入または吸入により、特異的宿主組織または細胞への薬剤または他の剤の標的を可能にし、それによって本来の形態で投与される毒性薬剤の望ましくない全身作用を最小限にする、微小球ドラッグデリバリーシステムを提供することに関する。それらおよび同様な目的、利点並びに特徴は、下記記載の本発明の方法および組成物によって達成される。

【0018】

【発明の好ましい態様の記載】様々な疎水性生体分解性ポリマーが本発明のドラッグデリバリーシステムに適当である。そのようなポリマーは当業者にとって周知である。適当なポリマーとしては、ポリエステル、ポリオルトエステルおよびポリ無水物が挙げられる。

【0019】ポリマーは、加水分解可能な内部結合を含み、従って生体分解性であるコポリマーおよびホモポリマーポリエステルを含んで成ることができる。典型的に

好ましいそのようなポリエステルは、ポリグリコール酸（PGA）およびポリ乳酸（PLA）、並びにポリグリコリドとL-ラクチドのコポリマー（PGL）である。上記のポリエステルは、それらの特徴としてヒトに対する低い毒性および事実上完全な生体分解性を有するため、本発明の方法および組成物に特に適する。もちろん、本発明に使用される特定のポリエステルまたは他のポリマー、オリゴマー、コポリマー等は限定的でなく、使用されるポリマーの入手源に関係なく、所望のドラッグデリバリーシステムを生じる本発明の新規加工方法の結果として様々な疎水性生体分解性ポリマーを使用できることは理解されるだろう。

【0020】従って、本発明における使用に適当な必要な低い毒性を証明する他の生体分解性または生体浸食性ポリマーまたはコポリマーとしては、例えば、ゼラチン、寒天、デンプン、アラビノガラクトン、アルブミン、コラーゲン、天然および合成材料またはポリマー、例えばポリ（ε-カプロラクトン）、ポリ（ε-カプロラクトン-CO-乳酸）、ポリ（ε-カプロラクトン-CO-グリコール酸）、ポリ（β-ヒドロキシブタン酸）、ポリエチレンオキシド、ポリエチレン、ポリ（アルキル-2-シアノアクリレート）（例えばメチル、エチル、ブチル等）、ヒドロゲル（例えば、ポリ（ヒドロキシエチルメタクリレート）、ポリ-ヒドロキシエチルメタクリレート）、ポリアミド（例えばポリアクリルアミド）、ポリ（アミノ酸）（例えばL-ロイシン、L-アスパラギン酸、β-メチル-L-アスパラギン酸、β-ベンジル-L-アスパラギン酸、グルタミン酸等）、ポリ（2-ヒドロキシエチル-L-アスパラギン酸アミド）、ポリ（エステル尿素）、ポリ（L-フェニアラニン/エチレングリコール/1,6-ジイソシアネートヘキサメチレン-2,4,8,10-テトラオキサスピロ[5,5]ウンデカン、1,6-ヘキサジオールポリオルトエステル、ポリ（ビス-p-カルボキシフェノキシプロパン無水物）、エチレン-酢酸ビニルコポリマー（EVA）、ポリビニルアルコール（PVA）およびシリコーンエラストマーが挙げられる。

【0021】本発明における使用に適当である前述の典型的な天然および合成ポリマーは、もちろん、商業的に容易に入手可能であるか、または適当なモノマー、コモノマーまたはオリゴマーからの縮合重合により得ることができる。例えば、グリコール酸と乳酸のホモポリマーとコポリマーは、Gilding, D.K., Reed, A.M., "Biodegradable Polymers for Use in Surgery - Polyglycolic/Poly(lactic acid) Homo- and Copolymers: 1", Polymers, 20, 1459(1979)により開示されたようにしてグリコリドおよびラクチドモノマーを反応させることにより、または直接重縮合により、調製することができる。

【0022】いずれのタンパク質またはペプチドでも本

発明のプラクティスに適当である。本発明において使用される生物活性タンパク質またはポリペプチドは、比較的小さい分子量のタンパク質またはポリペプチドである。本発明において使用される典型的な好ましい生物活性タンパク質は、カルシトニン、インスリン、アンギオテンシン、バソプレッシン、デスモプレッシン、LH-RH（黄体形成ホルモン放出ホルモン）、ソマトスタチン、グルカゴン、ソマトメジン、オキシトシン、ガストリン、セクレチン、h-ANP（ヒト心房性ナトリウム利尿ポリペプチド）、ACTH（副腎皮質刺激ホルモン）、MSH（メラニン細胞刺激ホルモン）、β-エンドルフィン、ムラミルジペプチド、エンケファリン、ニューロテンシン、ボンベシン、VIP、CCK-8、PTH（副甲状腺ホルモン）、CGRP（カルシトニン遺伝子関連ペプチド）、エンドセリン、TRH（甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン）、成長因子様エリスロポイエチン、リンホカイン様マクロファージ刺激因子等である。本発明において使用される種々のポリペプチドは、天然に存在するポリペプチドだけでなく、薬理的に活性なそれらの誘導体および類似体も包含する。例えば、本発明において使用するカルシトニンは、天然に存在する生成物、例えばサケカルシトニン、ヒトカルシトニン、ブタカルシトニン、ウナギカルシトニンおよびニワトリカルシトニンだけでなく、Toyo Jozo 社の製品である「Asu<sup>17</sup>」-ウナギカルシトニンエルカトニンといった類似体も包含する。同様に、本発明において使用するLH-RHは、天然物だけでなく医薬上活性な誘導体および類似体、例えば、上記に引用した種々の特許明細書および刊行物中に記載されているもの、例えばMatsumuraらの米国特許第3,917,825号に記載されているものも包含する。本発明における使用に特に好ましいポリペプチドは、カルシトニン、インスリン、ACTH、LH-RH、PTH、CGRP、ソマトスタチンおよびソマトメジンである。カルシトニンが最も好ましい。

【0023】生体分解性合成ポリペプチドとしては、ポリ（N-ヒドロキシアルキル）-L-アスパラギン、ポリ（N-ヒドロキシアルキル）-L-グルタミン、N-ヒドロキシアルキル-L-アスパラギンとN-ヒドロキシアルキル-L-グルタミンのコポリマーが挙げられる。

【0024】前述の用語の定義および更なる説明は当業界において公知であり、いずれかの標準生化学参考書、例えばAlbert L. Lehninger 著 "Biochemistry", Worth Publishers Inc.およびLubert Stryer 著 "Biochemistry", W.H. Freeman and Company（両者は参考として組み込まれる）への参照により見つけることができる。

【0025】本発明のドラッグデリバリーシステム中の生物活性タンパク質の量は、使用する特定のポリペプチドに依存して異なるだろうが、所望の薬理効果を惹起せ

10

20

30

40

50

しめるのに十分な量であろう。例えば、選択されたポリペプチドがカルシトニンである時、カルシトニンはパジェット病または高カルシウム血症または骨粗しょう症のような状態を治療するのに十分な量で存在するだろう。典型的な製剤は、ブタカルシトニンについては約0.01~約0.04 I.U./mgを含有するだろう。インスリンの場合、血糖値をコントロールし、よって糖尿病を治療するのに十分な量が典型的に使用され；LH-RHまたはその類似体の場合、雌の生殖系の様々な病気を治療するのに十分な量、避妊効果を有するのに十分な量、またはLH-RHに対する他のいずれかの既知の生体応答を惹起せしめるのに十分な量を使用され；PTH, CGRP, ソマトメジンまたはそれらの類似体の場合には、骨代謝の様々な病気を治療するのに十分な量を使用されるだろう。そして本発明により期待される他の生物活性ポリペプチドについてもそうである。このように、本発明のドラッグデリバリーシステムにおいて有用なタンパク質またはポリペプチドの量は、所望の治療効果を獲得するのに十分な量である。大要については、任意の標準的参考書、例えばGoodman およびGilman, The Pharmacological Basis of Therapeutics を参照することができる。

【0026】本発明のドラッグデリバリーシステムの性質および外観を改善するために、1または複数の賦形剤、着色剤、等張剤、酸化防止剤等をドラッグデリバリーシステムに付加することができる。例えば、スターチ、デキストリン、マンニトール、ソルビトール、シクロデキストリンおよびトラガカントといった賦形剤；β-カロチン、赤色2号および青色1号といった着色剤；塩化ナトリウムおよびグルコースといった等張剤；並びに\*

カルシトニン+ポリマー  $\rightleftharpoons$  カルシトニン-ポリマー

【0031】そのような系は、ポリマーマトリックス中へのタンパク質またはポリペプチドの取り込みに備え、その上、本体区画中に存在する時はマトリックスからのタンパク質またはポリペプチドの放出を可能にするだろう（この場合、放出されたタンパク質またはポリペプチドは本体区画の部位から拡散する）。

【0032】本発明のドラッグデリバリーシステムは、疎水性生体分解性ポリマーとタンパク質またはポリペプチドとの間の物理的相互作用の形成を考慮した任意の方法により調製することができる。2つのそのような方法として、ポリマー沈澱技術または微小球技術を言及することができる。

【0033】ポリマー沈澱技術では、■1に記載されるように、ポリペプチドとポリマーが適当な溶剤と一緒に混合され、均一液体状態を形成する。ポリペプチドとポリマーの両方が溶剤に可溶であり、且つ溶剤がポリマーまたはポリペプチドを分解したり不利な影響を与えたりしない限り、いずれの有機または無機溶剤でも使用することができる。

\*にアスコルビン酸、エリスロビン酸およびそれらの塩またはエステルといった酸化防止剤。そのような剤形の実際の調製方法は当業者に既知であるかまたは明白であろう。例えば、Remington's Pharmaceutical Science, 第17版, 1985, Alfonso R. Gennaro 編, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania 18042 を参照のこと。

【0027】賦形剤の性質は、好ましくは選択された剤形の製造を助けるだろう。或る剤形は、生物活性タンパク質またはポリペプチドの更に延長された放出を提供する。それらの延長された放出剤形は、タンパク質またはポリペプチドの投与において特に有用であり、増加された融通性を与える。

【0028】本発明の重要な特徴は、本発明の疎水性生体分解性ポリマーとタンパク質またはポリペプチドとの間に物理的相互作用が存在するという事実である。その物理的相互作用は、ポリマーとタンパク質/ポリペプチドとの間の親和力としてまたは或る型の会合もしくは相互作用として特徴付けることができる。

【0029】物理的相互作用または吸着は明白に解明されていないが、それでないものにより幾らか特徴付けることができる。相互作用は、性質が化学的でないように見える。即ちそれは共有結合、水素結合等ではない。この推論は示差走査熱量測定、赤外分光法、フーリエ変換赤外分光法、ラマン分光法およびフーリエ変換ラマン分光法に基づく。いずれかの理論に結び付けようとしなくても、本発明者らは相互作用が性質において疎水性であり、そしてアミノ酸鎖結合を伴うと考える。簡単に、それは下式のような平衡系として表すことができる。

【0030】

【化1】

カルシトニン-ポリマー

【0034】適当な溶剤としては、塩化メチレン、ヘキサフルオロアセトン、ヘキサフルオロイソプロパノール、アセトニトリル、ヘキサン、シクロヘキサン等が挙げられるが、それに限定されない。好ましい溶剤は塩化メチレン、ヘキサフルオロアセトンおよびヘキサフルオロイソプロパノールである。

【0035】ポリマーとタンパク質/ポリペプチドを溶液から強制的に引き出すことにより、沈澱物が得られる。沈澱は当業界で既知の任意の技術により達成することができる。適当な技術としては、ポリマーが可溶でない溶剤を添加すること、または溶液を冷却して沈澱を達成することが挙げられる。

【0036】好ましい沈澱技術は、タンパク質/ポリペプチドは可溶であるがポリマーが不溶である溶剤を使ってポリマーを強制的に溶液から引き出すことを伴う。適当な溶剤としては、水、水性緩衝液、水性アルコール性混合物等が挙げられる。適当な攪拌の条件下で、沈澱物の粒子サイズを調節することができる。次いで沈澱物を濾過しそして乾燥する。沈澱物はタンパク質/ポリペ



チドとポリマーとの間に物理的相互作用が存在する。インビボでのタンパク質／ポリペプチドの制御された開放性がそれによって達成される。

【0037】微小球技法が■2に示されるように使用される場合、約1～150ミクロン(μm)の間の直径を有する微小球の球状ポリマーマトリックスは、■4に示されるように非経■注入又は吸入を通して種々の器官又は器官系に向けるために狭い大きさの範囲で調製され得る。微小球の球状ポリマーマトリックスのためのより好ましい範囲は約0.5～70ミクロンである。

【0038】微小球は、連続した(非溶媒槽)に分散された予備選択されたポリマーの溶液からのポリマー(又はコポリマー)及び溶媒の均質混合物から成る乳化された液滴又は球体を形成することによって調製され得る。

(1)凍結乾燥又は(2)溶媒抽出のいずれか1つの又は組合しての方法による球体からの溶媒の除去が微小球を創造する。次にタンパク質又はポリペプチドが添加される。

【0039】特に、微小球法においては、所望のポリマー又はコポリマー及びタンパク質又はポリペプチド及び他の物質が適切な溶媒中に別々に溶解される。ポリマー及びポリペプチド溶液が、約2.5～18%w/wの間の一般的な範囲のポリマー濃度及び約1:1～1:100の間の範囲のポリペプチド／ポリマー比を提供するために一緒に混合される。得られる溶液の温度は一般的に約30°～45℃の間に調節される。分散された槽を含んで成るポリペプチド－ポリマー溶液が、界面活性剤を含む連続槽中に一般的に10°～20℃の範囲のサーモスタット制御された温度で分散される。当業界において知られているいずれかの界面活性剤が、それがポリマーとタンパク質／ポリペプチドとの間の活性又は相互作用を妨害しない限り、本発明の実施において適切であろう。前記のことは、当業界において知られているいずれかの方法により、特に、微細オリフィスノズルを通して分散された槽に圧力を付与することによって達成され得る。次に分散された槽の重量の5～20倍である連続槽が分散機により攪拌される。分散された槽の導入の後、2種の■収方法のうち1つの方法が、最終加工のために薬物充填微小球を安定化し、そして■収するために利用される。

【0040】より詳しくは、分散の後、凍結乾燥法に適合する温度は、10°～20℃、好ましくは15℃で2分間維持され、次に45°～55℃；好ましくは50℃に3分間にわたって上昇せしめられる。混合物の激しい攪拌がこの期間続けられる。温度が50℃に達した場合、冷媒溶液が槽からジャケットを通して循環し、又は容器がドライアイスに含浸され、そして薬物－ポリマー－溶媒槽を凍結し、そして連続槽を凍結しない温度に冷却される。懸濁液又はエマルジョン(液体連続槽における■体分散槽)はすばやく、予備冷却されたバイアル

(-40°～-60℃)に移され、そして凍結乾燥器、凍結器又はドライアイス－アセトン槽中で-40°～-60℃に冷却される。懸濁された液滴(微小球)及び連続槽溶媒中の溶媒は凍結乾燥により除去される。凍結乾燥サイクルの完結後、微小球は適切な溶媒により洗浄され、濾過され、そして空気乾燥せしめられる。

【0041】本発明の溶媒抽出法において、分散の後、温度が10°～20℃、好ましくは15℃で2分間維持され、次に45°～55℃、好ましくは50℃に3分間にわたって上げられる。次に分散液は、室温で希釈溶媒を含む容器に移され、又は希釈溶媒が分散液に添加される。攪拌が適切な混合技法を用いて約30分間続けられる。その工程の間、分散された槽溶媒がポリペプチド－ポリマー溶媒エマルジョン液滴から除去され、液滴の凝■が引き起こされる。次に■体球を濾過により除き、適切な溶媒により洗浄し、そして空気乾燥せしめられる。

【0042】分散された槽及び連続槽のための溶媒はもちろん、槽分離を達成するために異なるであろうし、そして従って、個々の槽のための溶媒必要条件に基づいて選択される。より詳しくは、分散された槽のための溶媒は好ましくはポリマー及び導入された物質を溶解し、そして希釈溶媒により浸出され又は気化又は蒸発により除去されるまで、連続槽中における薬物及びポリマーと共に乳化された液滴に存続すべきである。この場合、孔が任意に、薬物－ポリマー－マトリックスに形成される。水溶性マーカ－又は物質が導入されるポリグリコール酸の場合、ヘキサフルオロアセトンセスキ水合物が適切な溶媒である。ポリマー及び導入される物質の特徴に依存して、使用され得る他の溶媒は、水、ヘキサフルオロイソプロパノール、塩化メチレン、アセトニトリル、テトラヒドロフラン、ヘキサン及びベンゼンを包含する。連続槽のための溶媒は、ポリマーを溶解すべきでなく、そして分散槽を乳化すべきである。適切な溶媒は、ベンゼン、ジオキサン、アセトン、塩化メチレン、クロロホルム、四塩化炭素、トルエン、エチルアルコール、アセトニトリル、p-キシレン、テトラヒドロフラン、鉱油、グリセリン及びそれらの溶媒の混合物を包含するが、僅しこれだけには限定されない。

【0043】希釈(非溶媒)槽はまた、ポリマーポリペプチド溶液の分散に続いて、連続槽を希釈するためにも使用され得る。希釈剤は連続槽及び分散槽溶媒と混和性であるが、しかしポリマー又は導入された物質を溶解すべきでない。適切な溶媒の例は、1,4-ジオキサン、シクロヘキサノン、アセトン、エタノール、イソプロパノール、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド、テトラヒドロフラン、シクロヘキサノール及び同様のものを包含する。

【0044】分散槽におけるポリマーの濃度は、最終微小球生成物における多孔度又は“ボイド”空間並びに微小球の形状に直接影響を及ぼす。2.5%～10%w/

wのポリマーの濃度は寸法的に適切な球状粒子をもたらす。タンパク質又はポリペプチドの濃度に関しては、50重量%までのポリマーが適切な結果を伴って達成された。

【0045】一定の加工パラメーターが本発明の■収方法及びその得られる微小球に影響を及ぼすことが決定された。同定できるパラメーターは、分散槽におけるポリマーの濃度、分散の時点での分散槽の温度、分散槽における界面活性剤の濃度及び分散槽におけるポリマー対導入される物質の比を包含する。上記及び例に言及される濃度、温度及び比は操作可能な範囲を示し、そして他の数字による表現は種々の溶媒、ポリマー、タンパク質、ポリペプチド及び同様のものが選択される場合、適用することができる。

【0046】本発明者は、タンパク質／ポリペプチドと本発明のポリマーとの間の相互作用が独得であることを強調する。従来技術においては、活性薬物物質とポリマーとの間の親和性は存在しなかった。実際、多くの場合、薬物の親和性は、ポリマー及び薬物が溶解される溶媒のためにより高かった。従って、従来技術のシステムにおいて、ポリマーが溶液から沈殿される場合、薬物は溶液に優先的に存続する。

【0047】本発明の薬物投与システムは、非経■（たとえば静脈内、動脈内、筋肉内、皮下又は眼内）又は吸入路による投与のために適切であり、そしてそのような投与が生物利用可能性を高め又は副作用を減じる場合、経■及び鼻腔内投与のためにも使用され得る。特に、適切な大きさの範囲、すなわち約0.5  $\mu\text{m}$ ～約5  $\mu\text{m}$ の高分子粒状システムもまた、胃腸管の粘膜内層細胞による吸収及び／又は飲細胞運動のために経■投与され得る。そのような投与は、身体の全身、リンパ及び分泌システムを損わないで導入される物質の移行を可能にする。

【0048】本発明の薬物投与システムは、単独で又は投与及び従来の医薬実施の意■された経路に対して適切に選択された適切な医薬希釈剤、キャリアー、賦形剤又はアジュバントと共に混合して投与され得ることは、当業者によって明らかであろう。たとえば、非経■注入のためには、投与単位形が、静脈内、筋肉内又は皮下投与を達成するために使用され、そして非経■投与のためには、等張性の役割をはたす適切な溶質を任意に含む、適

切な殺菌水溶液又は非水溶液が使用されるであろう。同様に、吸入投与単位形に関し、鼻及び咽喉又は気管支肺組織の粘膜を通しての投与のためには、適切なエアゾール又は噴霧吸入組成物及び装置が利用されるであろう。

【0049】本発明の他の好ましい態様に適合する本発明の薬物投与システムは、予備選択された標的細胞、組織又は器官にそれらに導入される薬物の開放の標的を都合良く向けるためにさらに被覆され又は変性され得る。たとえば、薬物投与システムは、種々の物質、たとえば微小球に導入されるものと同じか又は異なるポリマー、タンパク質、界面活性剤、抗体又は受容体部位特異的薬物により被覆され、これによって導入される薬物の開放性が標的システムで集中される。さらに、皮膚は、経■投与後の保護をもたらす、そして胃を通して移行するためにpH感受性であることができる。本発明及びその利点を例示するために、次の特定の例を与えたが、これは例示■的のためであって、本発明を限定するものではない。

#### 【実施例】

#### 20 【0050】例1

サケカルシトニンとポリグリコール酸との分子相互作用  
この例は、サケカルシトニンと40,000ドルトンの分子量を有するポリグリコール酸(PGA)との間の化学的及び／又は物理的関連を定量化するように向けられた。約5mgのカルシトニンを定量し、そして個々の一連の5mLのメスフラスコに置いた。ヘキサフルオロアセトンセスキ水和物(HFA)を、カルシトニンが完全に溶解するまで滴下した。HFA中、5%PGA溶液を個々のフラスコに定量的に滴下し、0～26.3mgの範囲を包含するPGAの質量を付与した。フラスコを5分間攪拌し、溶液を混合した。次に個々のフラスコをリン酸緩衝液(pH7.3)により5mLのマークまで充填した。緩衝液の添加は、PGA+ポリマーにより結合されたいづれかのカルシトニンを沈殿せしめた。得られた混合物を遠心分離し、そして上清液をサケカルシトニン含有率について分光光度計により分析した。PGA(40,000Mw)26mgが約4.1mg(83%)のサケカルシトニンを除去した。得られた結果は下記表1に示される。

#### 【0051】

#### 40 【表1】

PGA質量 (mg)	17 上清液 ABS(275nm)	カルシトニン 濃度 (mg/mL)	除去されたカル シトニン (mg)	18 除去された% カルシトニン
0.00	0.390	1.020	0.099	1.90
5.73	0.342	0.895	0.125	2.71
7.81	0.285	0.746	1.07	22.3
7.89	0.356	0.932	0.340	6.80
11.8	0.213	0.558	1.71	38.0
13.2	0.257	0.673	1.64	32.7
14.0	0.220	0.576	2.02	41.2
15.8	0.176	0.461	2.69	53.7
18.4	0.086	0.226	3.87	77.4
10.4	0.165	0.432	2.54	54.0
21.0	0.068	0.175	4.10	82.1
22.3	0.161	0.422	2.95	58.6
23.7	0.105	0.276	3.62	72.4
26.3	0.066	0.174	4.13	82.6

## 【0052】例2

サケカルシトニンとポリ（グリコール-乳酸）との分子相互作用

50,000の分子量を有するポリ（グリコール-乳酸）（PGL）の調製方法は、PGAのために使用された方法に類似するが、僅しヘキサフルオロ-2-ブ\*30

\*ロパノールがHFAの代わりに使用された。サケカルシトニンの80%以上を8mg以上のPGLが除去した。結果は表2に示される。

## 【0053】

## 【表2】

PGL質量 (mg)	上清液 ABS(275nm)	カルシトニン 濃度 (mg/mL)	除去されたカル シトニン (mg)	除去された% カルシトニン
0.00	0.360	0.941	0.591	11.1
2.64	0.306	0.801	0.995	19.9
4.13	0.210	0.550	2.15	43.9
5.52	0.191	0.501	2.69	51.8
6.51	0.147	0.386	2.87	59.8
8.45	0.065	0.172	3.64	80.8
11.53	0.047	0.125	4.37	87.5
13.57	0.027	0.0725	4.44	92.5
20.97	0.034	0.0908	4.95	91.6

## 【0054】例3

サケカルシトニンとポリ乳酸との分子相互作用

50,000の分子量を有するd1タイプのポリ乳酸

（PLA）の調製方法はPGAのために使用された方法に類似するが、僅し、塩化メチレンがHFAの代わりに使用され、そしてカルシトニンが塩化メチレンに溶解さ

れるよりもむしろ懸濁された。さらに、塩化メチレン及び緩衝液は混和性でないで、サケカルシトニンが緩衝液中、塩化メチレンから抽出された。水性相を分離し、遠心分離し、そして上清液をサケカルシトニンについて\*

\* 分光光度計により分析した。結果は表3に示される。

【0055】

【表3】

PLA質量 (mg)	上清液 ABS(275nm)	カルシトニン 濃度 (mg/mL)	除去されたカル シトニン (mg)	除去された% カルシトニン
0.00	0.401	1.05	0.055	1.03
2.68	0.226	0.592	2.04	40.8
4.81	0.186	0.488	2.36	47.2
10.28	0.147	0.386	2.77	55.4
14.95	0.105	0.276	3.62	72.4
20.40	0.159	0.417	3.02	60.3

【0056】例4

約100mgのPGA (Mw40,000)をバイアルに置いた。リン酸緩衝液 (pH7.3) 中、1mg/mLのカルシトニン溶液10mLを前記バイアルに添加した。ポリマーを、超音波槽にバイアルを10分間置くことによって、カルシトニン溶液に懸濁した。次にその懸濁液を遠心分離し、そして上清液を分光光度計により分析した。この※

※方法を、PGA (Mw100,000)、PGL及びPLA (dl-タイプ) ポリマーについてくり返し、そしてすべての定量はPGL及びPLA試験のためには半分にされた。結果は表4に示される。

【0057】

【表4】

ポリマー	質量 (mg)	上清液 ABS(275nm)	除去されたカル シトニン (mg)	mg sCT/除去 されたポリマー
PGA (40,000)	99.1	0.4022	0.723	0.723/99.1
PGA (100,000)	99.3	0.3501	1.143	1.143/99.3
PGL (50,000)	50.0	0.4144	0.457	0.457/50.3
PLA (dl-type) (50,000)	50.0	0.2474	2.772	2.772/50.0

【0058】純粋なポリマーは5.5%までの結合親和性を示し、これは沈殿工程の間、分子間相互作用よりも低かった。PLA (dl-タイプ) は、1mg/mLの溶液に懸濁される場合、サケカルシトニンと結合する最高の親和性を示した。PGA系は、凍結乾燥技法により微小球を調製するための選択的ポリマーであるので、薬物とポリマーとの間の関係の性質を決定するためにいくつかの努力が行なわれた。示差走査熱量計を用いて、これらの物質が微小球に結合される場合、それらのサケカルシトニン及びPGAの融点のいくつかの変動が存在した。変化はまた、I. R. 及びRamanスペクトルでも観察された。これらのすべては、関連を示唆するが、しかし結論的には相互作用の正確な性質への点を示唆しない。しかしながら、Fourier Transter Raman分光計はいづれの識別できる差異も示さなかった。これは、相互作用が性質上化学的又は共有的でないことを示唆する。

【0059】例5

サケカルシトニン-PGA沈殿システムの調製

1. 水による沈殿

サケカルシトニン49.3mgをバイアルに置き、そしてHFAセスキ水化物0.35mLにより溶解した。PGA450mgを含む10%PGA-HFA溶液4.5gを、磁気攪拌棒により攪拌しながら、前記溶液に滴下した。その混合物をさらに5分間攪拌した。次にpH7.3のリン酸緩衝液を、前記混合物に添加し、ポリマーを沈殿せしめた。混合物を渦ミキサーを用いてさらに2分間攪拌し、そして次に3000rpmで10分間遠心分離した。上清液を分析のために保存し、そして沈殿物を低圧チャンバー中において数時間乾燥せしめた。上清液中のサケカルシトニン含有率を分光光度計により分析し、そしてポリマーにより除去された活性剤の量を計算した。容量は、ポリマーの6.0~8.0重量%であった。

【0060】2. エチルアルコールによる沈殿緩衝液をエタノールにより取り換え、ポリマーを沈殿せしめ、収率を改良した。合計の■体投入量（ポリマー＋サケカルシトニン）は、この調製において502mgであった。6. 4～8. 0%の容量が使用された。

#### 【0061】例6

##### サケカルシトニン-PGA微小球及び沈殿物の特徴化

##### 1. 対照微小球

##### a) 薬物容量

微小球を、100, 000の分子量のポリグリコール酸を用いて例5に記載されているようにして調製した。ポリグリコール酸とサケカルシトニンとの関連傾向のために、実際の薬物容量を決定するための沈殿技法を使用することは不可能であった。緩衝液中での30分間の抽出技法は、実際のサケカルシトニン含有量の表示である。抽出方法及びHPLC分析により、8. 21%w/wの薬物含有率は、82%の導入効力として計算された。

##### 【0062】b) サケカルシトニンのインビトロでの開放

20mgのPGA-サケカルシトニン微小球を試験管中に充填した。EDTAを含む0. 1Mリン酸緩衝液(pH 7. 4) 20mLを添加し、そしてそれらの試験管を37℃の水槽に移した。この研究の結果は■5に示される。19μgのサケカルシトニン/mg微小球が初期に一気に開放された。この初期開放の後、2時間以下で合計の薬物の50%の早い開放性が伴った。この点で、遅い開放が続く、そして22μgのサケカルシトニン/mg微小球（合計薬物の22%）が続く29時間で開放された。この研究からのデータは、サケカルシトニンが約35時間、緩衝液中で安定して存続することを示唆した。

#### 【0063】2. 沈殿物

##### a) 大きさの分布

HIA C/ROYCOカウンターサイズ分析器を用いて、大きさの分布についての薬物入りの沈殿物を分析した。■2に示されるように、D<sub>50</sub>、すなわち数メジアン直径は約2. 8μmであり、そして粒子の99%が2～10μmの範囲で存在した。幾何学標準偏差、δg = 1. 83は、まずまずの単分散性の表示である。MM D、すなわち質量メジアン直径は、4. 39μmであることが計算された。

##### 【0064】b) 沈殿物からのサケカルシトニンのインビトロ開放

サケカルシトニン-PGA沈殿物の2種の18mgのサンプルを試験管に定量的に移した。EDTAを含む0. 1Mのリン酸緩衝液(pH 7. 4) 10mLをそれらのサンプルに添加し、そして37℃の振盪浴中に置いた。サンプルを予定された時間間隔で抜き取り、そして薬物含有量について分析した。■6に示されるように、初期開放は急速であった。22%の開放がゼロ時で生じ、続いて2時間以内で合計薬物のさらに21%が開放された。この

後、次の30時間、約0. 1%/時の無視できる開放性が伴った。有意な量のサケカルシトニンは、マトリックス内にまた存在するか又はポリマーに結合されているように思える。

#### 【0065】例7

##### 生物分解性微小球からのサケカルシトニン持効性のインビトロ評価

サケカルシトニンを含む生物分解性微小球を、■2に示されるように、凍結乾燥技法を用いて、40, 000Dのポリグリコール酸により調製した。種々のサケカルシトニン含有量のサケカルシトニン微小球を、粒度、多孔度、比表面積及びインビトロ開放性について特徴づけた。長期の低カルシウム血症効果を、雄のWistarラットに皮下注射し、続いて一定の時間間隔で大腿動脈カテーテルを通して血液採取し、そして血清カルシウム濃度についてアッセイすることによって評価した。0. 3, 4. 5及び7. 5%の薬物含有率が評価され、そして0. 3%のレベルは、長期の低カルシウム血症効果を生成する上で効果的であることが見出された。この薬物充填により、体重100g当たりサケカルシトニン40, 120及び360mUを含むサケカルシトニン微小球が■7に示されるようにして投与された。低カルシウム血症効果は、遊離サケカルシトニンに関しての2～3時に比べて、サケカルシトニン微小球に関しては24時間維持された。さらに、サケカルシトニンの血液レベルは、5日間、基本線よりも高い濃度で維持された。

【0066】前記の記載から、当業者は、本発明の必須の特徴を容易に確かめることができ、そして本発明の範囲内で、種々の変更及び/又は修飾を行なうことができる。

#### 【■面の簡単な説明】

【■1】これは、本発明の薬物投与システムを調製するための沈殿方法の説明である。

【■2】これは、本発明の薬物投与システムを調製するための微小球方法の説明である。

【■3】これは、サケカルシトニン(sCT)とポリマーの種々のモル濃度でのポリグリコール酸、ポリ乳酸及びグリコリドとL-ラクチドとのコポリマーとの相互作用を示す■である。

【■4】これはサケカルシトニン及びポリグリコール酸微小球のサイズ分布のグラフである。

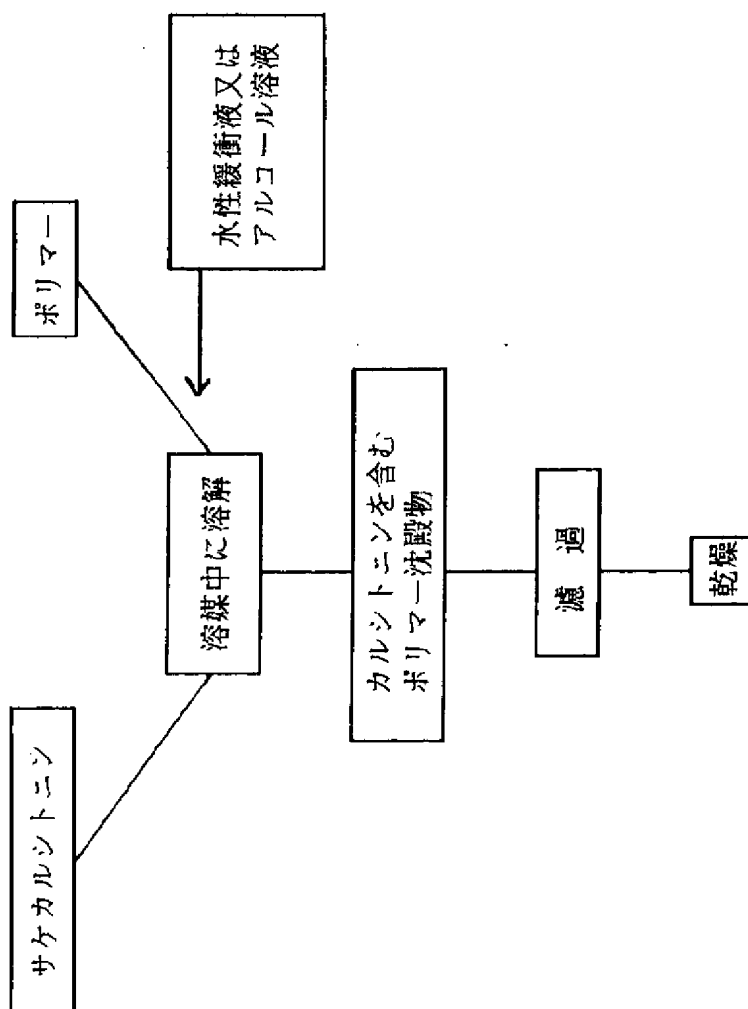
【■5】これは、凍結乾燥により調製されたポリグリコール酸(Mw=100, 000)及びサケカルシトニン微小球からのサケカルシトニンの開放の■であり、そして標的薬物含有率は10%であった。

【■6】これは、ポリグリコール酸-サケカルシトニン沈殿物からのサケカルシトニンの開放の■であり、そして標的薬物の含有率は10%であった。

【■7】これは、サケカルシトニン/微小球薬物投与システムの時間にわたっての血清カルシウム濃度の■であ

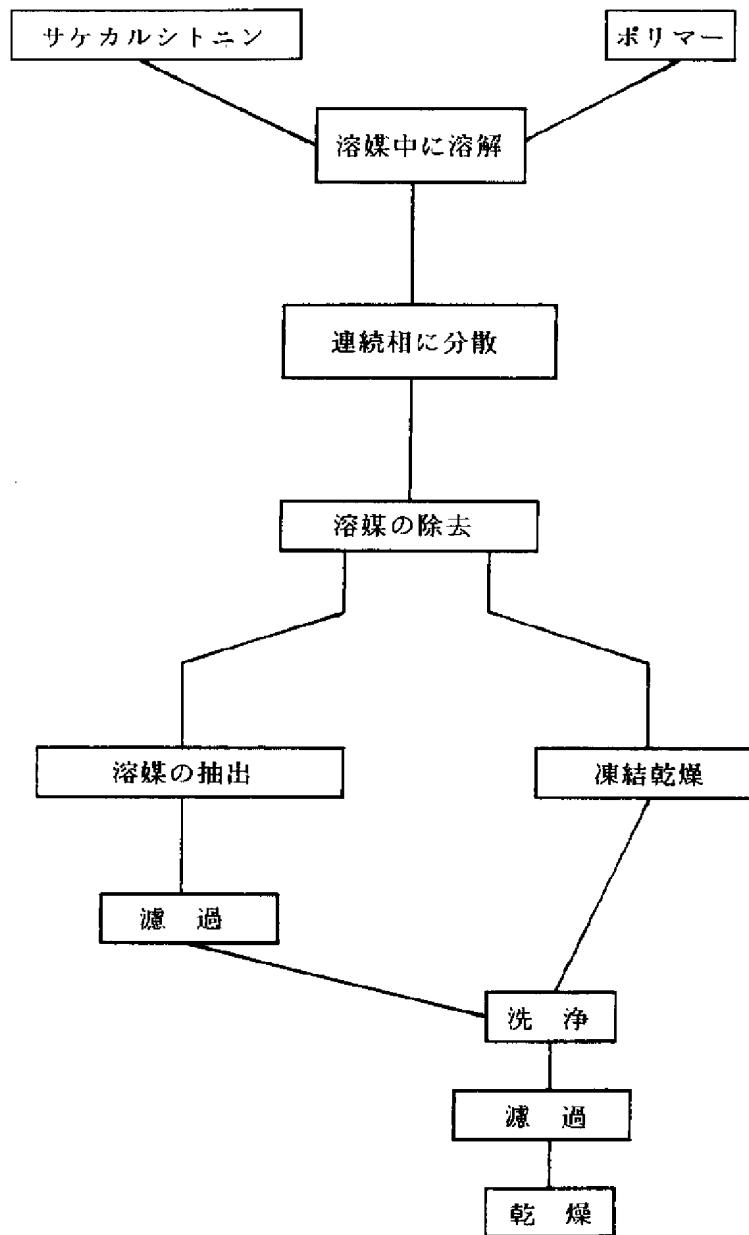
## 【■1】

## 沈 殿 方 法



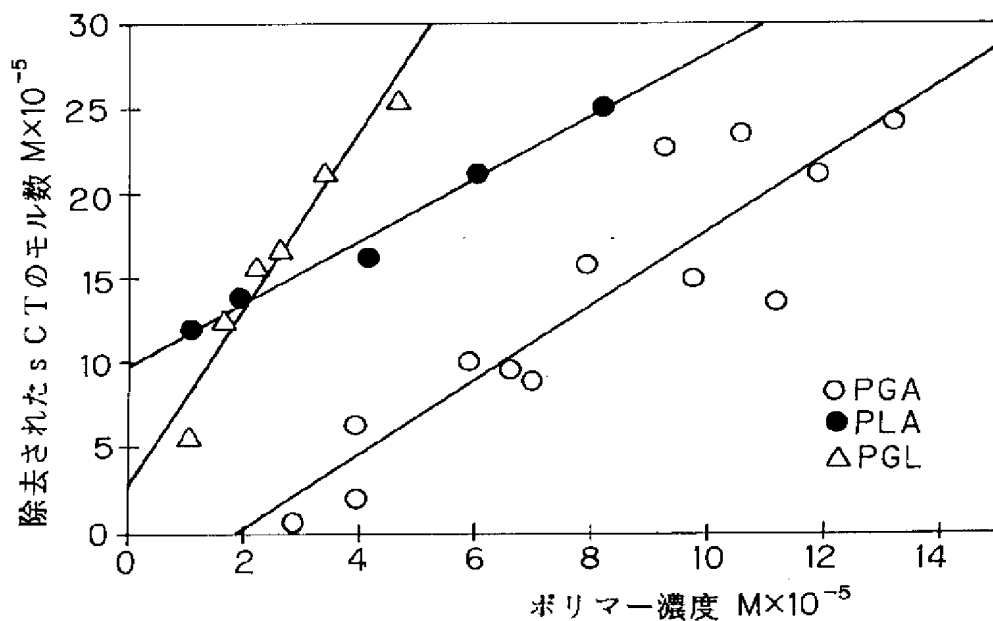
## 【■2】

## 微小球方法



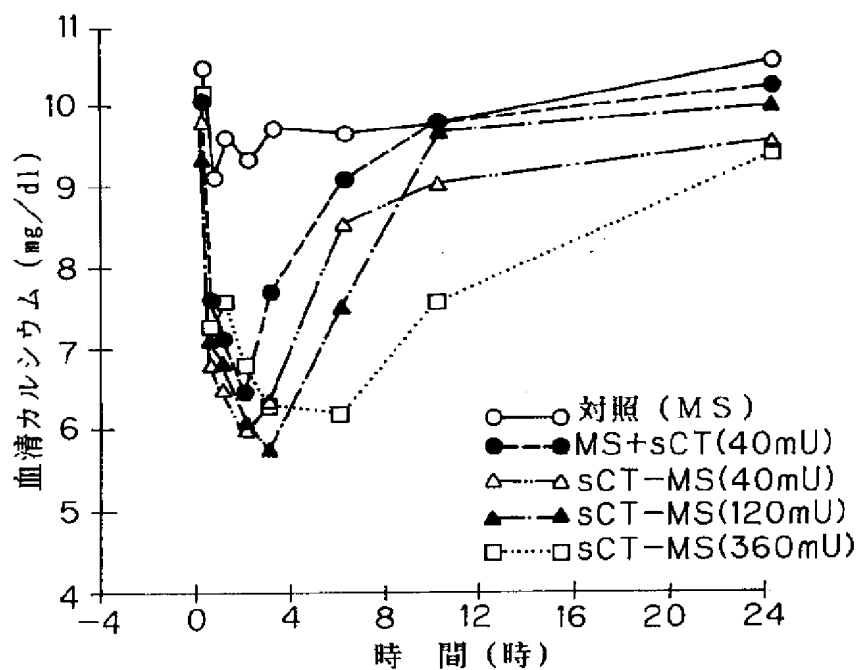
## 【■3】

沈殿に基づく s C T とポリマーとの相互作用



## 【■7】

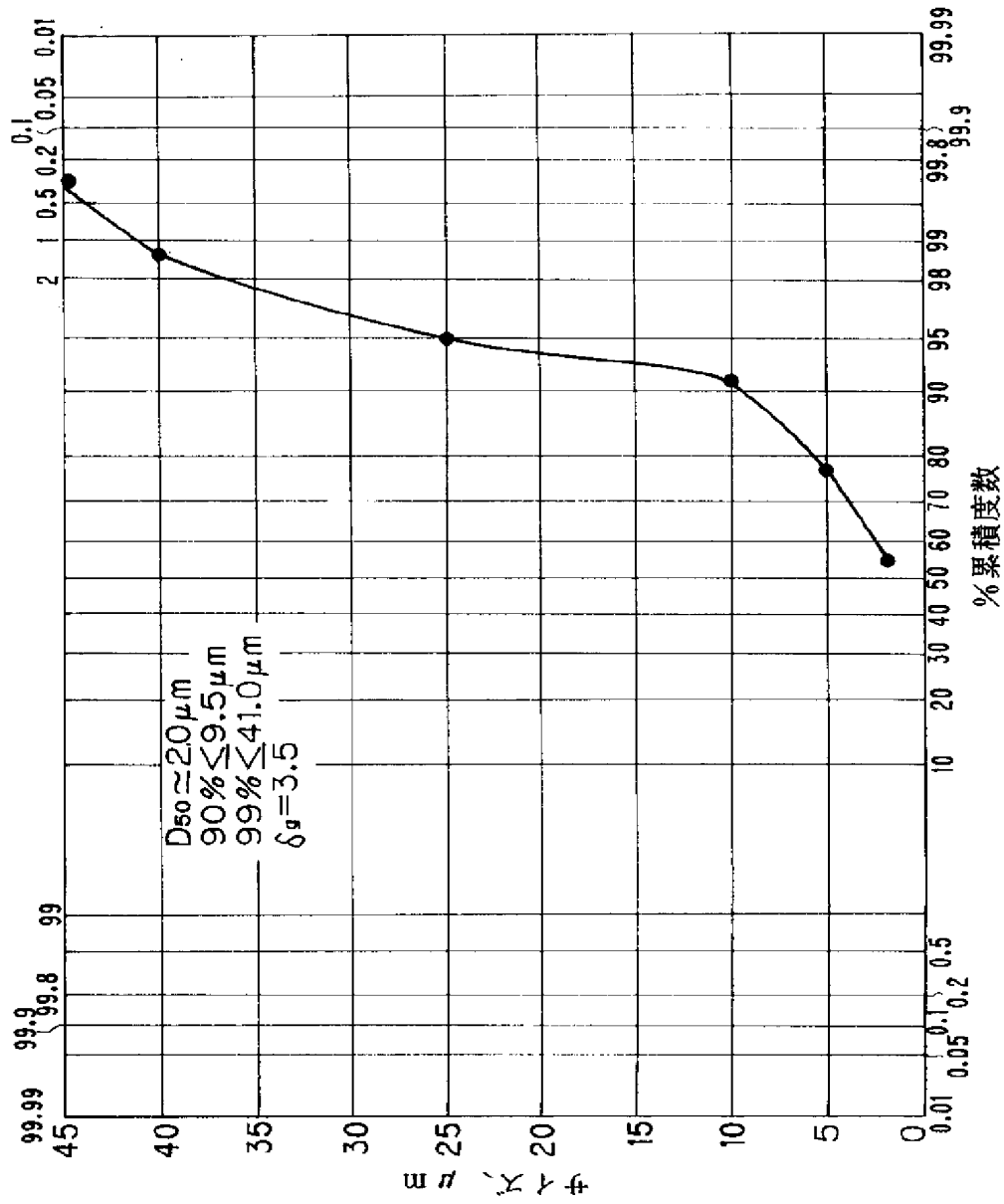
投与レベルの効果  
(0.3% sCT-MS, mU/100mg)





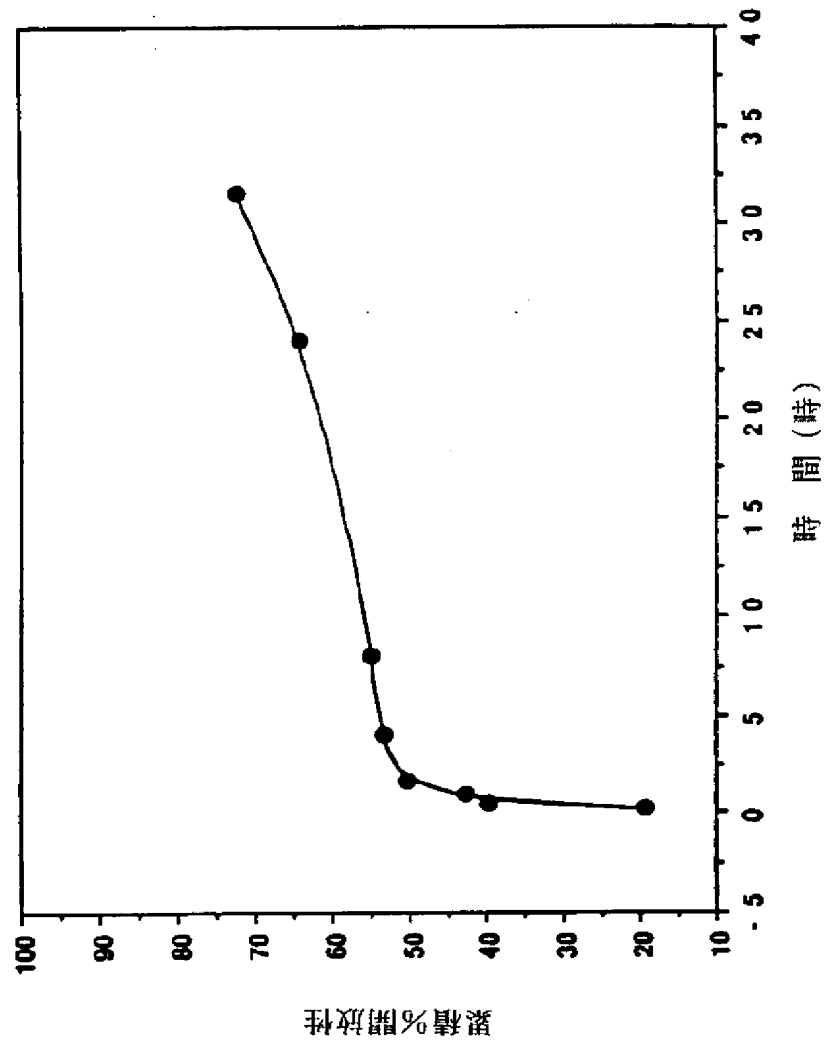
## 【■4】

s C - P G A 微小球のサイズ分布



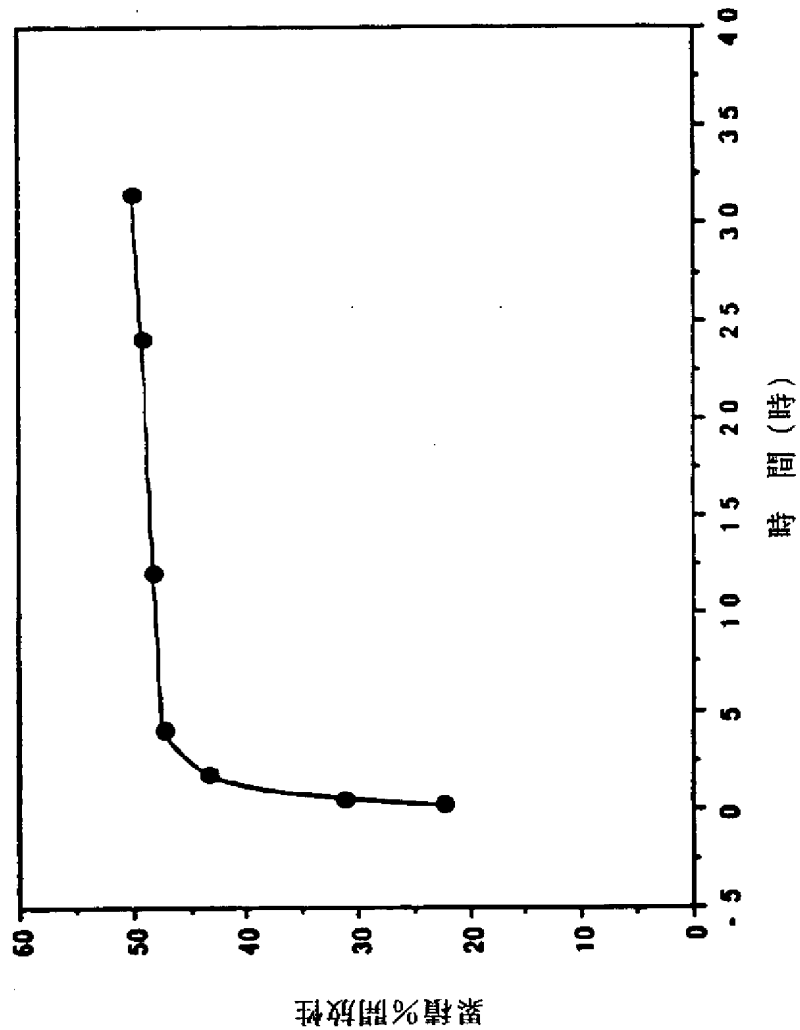
## 【■5】

凍結乾燥により調製されたPGA (MW=100,000) - SCT  
微小球からのSCTの開放性 (薬物含有率=10%)



## 【■6】

P G A - S C T 沈殿物からの S C T の開放性  
(薬物含有率=10%)



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>  
A 6 1 K 47/48

識別記号 庁内整理番号  
C 7329-4C

F I

技術表示箇所